

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/064760 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01144

(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Februar 2002 (05.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 101 05 911.6 9. Februar 2001 (09.02.2001) DE

(71) Anmelder (nur für DE): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (DE).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von DE, US): FHOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MUELLER, Rainer [DE/DE]; An der Freiheit 54, 82377 Penzberg (DE). THALHOFER, Johann-Peter [DE/DE]; Krottenkopfstrasse 9b, 82362 Weilheim (DE). GEIPEL, Frank [DE/DE]; Nelkenstrasse 23, 82377 Penzberg (DE). GLASER, Stephan [DE/DE]; Heimgartenstrasse 5, 82402 Seeshaupt (DE). HOELKE, Werner [DE/DE]; An der Freiheit 73, 82377 Penzberg (DE). SCHOEN,

Helmut [DE/DE]; Grube 4a, 82377 Penzberg (DE). KIRSCHBAUM, Thomas [DE/DE]; Humboldstrasse 3, 81543 Muenchen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): CA, CN, CZ, JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für die folgenden Bestimmungsstaaten CA, CN, CZ, JP
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/064760 A2

(54) Title: EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINASE K FROM <I>TRITIRACHIUM ALBUM</I> IN YEAST

(54) Bezeichnung: EXPRESSION DER REKOMBINANTEN PROTEINASE K AUS TRITIRACHIUM ALBUM IN HEFE

(57) Abstract: The invention relates to a method for the expression in solution of a proteinase K encoding gene in yeast, for example in *Pichia pastoris*, and subsequent secretion thereof into the culture medium. The invention further relates to a purification method of the heterologously expressed and secreted proteinase K.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur löslichen Expression eines für die Proteinase K kodierenden Gens in Hefe, z.B. in *Pichia pastoris*, mit anschließender Sekretion in das Kulturmedium. Des weiteren wird ein Aufreinigungsverfahren der heterolog exprimierten und sekretierten Proteinase K beschrieben.

### Expression der rekombinanten Proteinase K aus *Tritirachium album* in Hefe

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanter Proteinase K in löslicher und aktiver Form in wirtschaftlich interessanten Mengen

Proteinase K (E.C. 3.4.21.64, bekannt auch als Endopeptidase K) ist eine extrazelluläre Endopeptidase, die von dem Pilz *Tritirachium album* Limber synthetisiert wird. Sie gehört zur Klasse der Serinproteasen mit der typischen katalytischen Triade Asp<sup>39</sup>-His<sup>69</sup>-Ser<sup>224</sup> (Jany, K.D. et al. (1986) *FEBS Letters* Vol. 199(2), 139-144). Da die Sequenz der 279 Aminosäuren langen Polypeptidkette (Gunkel, F.A. und Gassen, H.G. (1989) *Eur. J. Biochem.* Vol. 179(1), 185-194) und die dreidimensionale Struktur (Betzel, C. et al. (1988) *Eur. J. Biochem.* Vol. 178(1), 155-71) eine hohe Homologie mit den bakteriellen Subtilisinen aufweist, wird Proteinase K zur Subtilisinfamilie gezählt (Pahler, A. et al. (1984) *EMBO J.* Vol. 3(6), 1311-1314; Jany, K.D. und Mayer, B. (1985). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, Vol. 366(5), 485-492). Benannt wurde die Proteinase K auf Grund ihrer Fähigkeit, natives Keratin zu hydrolysieren und somit dem Pilz ein Wachstum auf Keratin als einziger C- und N-Quelle zu ermöglichen (Ebeling, W. et al. (1974) *Eur. J. Biochem.* Vol. 47(1), 91-97). Proteinase K ist mit einer spezifischen Aktivität von über 30 U/mg eine der aktivsten bekannten Endopeptidasen (Betzel, C. et al. (1986)/*FEBS Lett.* Vol. 197(1-2), 105-110) und hydrolysiert unspezifisch native sowie denaturierte Proteine.

Die Proteinase K aus *Tritirachium album* Limber wird im natürlichen Wirt als Präproprotein translatiert. 1989 wurde durch Gunkel, F.A. und Gassen, H.G. (1989) *Eur. J. Biochem.* Vol. 179(1), 185-194 die Sequenz der cDNA des Gens, das für die Proteinase K codiert, entschlüsselt. Demnach setzt sich das Gen für die Präproproteinase K aus 2 Exons zusammen und codiert für eine 15 Aminosäuren lange Signalsequenz, eine 90 Aminosäuren lange Prosequenz und eine 279 Aminosäuren lange reife Proteinase K. Ein 63 bp langes Intron befindet sich im Bereich der Prosequenz. Das Präpeptid wird bei der Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten. Über die daran anschließende Prozessierung zur reifen Proteinase K unter Abspaltung des Propeptids ist heute noch sehr wenig bekannt.

Die reife Proteinase K besteht folglich aus 279 Aminosäuren. Die kompakte Struktur wird durch zwei Disulfidbrücken und zwei gebundene Calciumionen stabilisiert. Dies erklärt, warum Proteinase K im Vergleich zu anderen Subtilisinen eine deutlich höhere Stabilität gegenüber extremen pH-Werten, hohen Temperaturen, chaotropen Substanzen und Detergenzien zeigt (Dolashka, P. et al. (1992) *Int. J. Pept. Protein. Res.* Vol. 40(5), 465-471). Proteinase K zeichnet sich durch eine hohe Thermostabilität (bis 65°C, Bajorath et al. (1988), *Eur. J. Biochem.* Vol. 176, 441-447) und einen weiten pH-Bereich (pH 7,5-12,0, Ebeling, W. et al. (1974) *Eur. J. Biochem.* Vol. 47(1), 91-97) aus. Die Aktivität wird in Anwesenheit von denaturierenden Substanzen wie Harnstoff oder SDS gesteigert (Hilz, H. et al. (1975) *J. Biochem.* Vol. 56(1), 103-108; Jany, K.D. und Mayer, B. (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, Vol. 366(5), 485-492).

Die oben genannten Eigenschaften machen die Proteinase K insbesondere bei solchen biotechnologischen Anwendungen interessant, bei denen ein unspezifischer Proteinabbau erforderlich ist. Besonders zu erwähnen ist hier die Nukleinsäureisolierung (DNA oder RNA) aus Rohextrakt und die Probenvorbereitung bei der DNA-Analytik (Goldenberger, D. et al. (1995) *PCR Methods Appl.* Vol. 4(6), 368-370; US 5,187,083; US 5,346,999). Weitere Anwendungen liegen im Bereich der Proteinanalytik wie z.B. der Strukturaufklärung.

Proteinase K wird kommerziell in großen Mengen durch Fermentation des Pilzes *Tritirachium album* Limber (z.B. CBS 348.55, Merck Stamm No. 2429 oder Stamm ATCC 22563) gewonnen. Die Produktion der Proteinase K wird dabei jedoch durch Glucose oder freie Aminosäuren supprimiert. Da proteinhaltige Medien darüber hinaus die Expression der Proteasen induzieren, müssen als einzige Stickstoffquelle Proteine wie BSA, Milchpulver oder Sojabohnenmehl verwendet werden. Die Sekretion der Protease beginnt, sobald die stationäre Phase des Wachstums erreicht ist (Ebeling, W. et al. (1974) *Eur. J. Biochem.* Vol. 47(1), 91-97).

Da demzufolge *Tritirachium album* Limber für eine Fermentation in großem Maßstab schlecht geeignet ist und darüber hinaus genetisch schwer manipulierbar ist, wurden verschiedene Versuche unternommen, eine Überexpression von rekombinanter Proteinase K in anderen Wirtszellen zu erreichen. Wegen mangelnder Expression, Bildung von inaktiven "inclusion bodies" oder Problemen bei der Naturierung konnten jedoch bei diesen Versuchen keine signifikante Aktivität nachgewiesen werden (Gunkel, F.A. und Gassen, H.G. (1989) *Eur. J. Biochem.* Vol. 179(1), 185-194; Samal, B.B. et al. (1996) *Adv. Exp. Med. Biol.* Vol. 379, 95-104).

*Tritirachium album* Limber ist ein langsam wachsender Pilz, der nur geringe Mengen an Proteasen in das Medium sezerniert. Nachteilig ist der im Vergleich zu Hefe langsamere Zellzyklus so-

wie die geringere erreichbare optische Dichte im Fermenter. Außerdem ist es bekannt, daß T. album außer Proteinase K auch andere Proteasen produziert, welche die Präparation verunreinigen könnten (Samal, B.B. et al. (1991). *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 13, 66-70).

Die Expression der Proteinase K in *E. coli* ist zwar prinzipiell möglich, erfolgt jedoch nicht in löslicher Form, sondern in sogenannten "inclusion bodies", aus denen das Enzym anschließend durch bestimmte Maßnahmen solubilisiert und renaturiert werden muß. Der Nachteil dieser Methode ist, daß bei der Solubilisierung und Renaturierung viel Protein verloren geht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanter Proteinase K in wirtschaftlich interessanten Mengen zur Verfügung zu stellen.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß es möglich ist, eine rekombinante Proteinase K als zymogene Vorstufe in löslicher Form in Hefe zu exprimieren und zu sekretieren, wobei eine autokatalytische Aktivierung zur aktiven Proteinase K erfolgt. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Aufreinigung der aktiven Proteinase K aus dem Mediumüberstand.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanter Proteinase K umfassend die Schritte

- a) Transformation einer Wirtszelle mit einem Vektor enthaltend eine für die zymogene Vorstufe der Proteinase K kodierende DNA, wobei diese stromaufwärts der kodierenden Sequenz mit einer Sequenz im Leserahmen fusioniert ist, welche für ein Signalpeptid kodiert und unter Kontrolle eines für die Wirtszelle geeigneten Promotors steht,
- b) Expression der zymogenen Vorstufe der Proteinase K
- c) Sekretion und autokatalytische Aktivierung der Proteinase K
- d) Isolierung und Reinigung der Proteinase K,  
dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Wirtszelle um Hefezellen handelt und das Protein in löslicher Form von diesem Expressionswirt sekretiert wird.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Wirtszelle aus der folgenden Gruppe ausgewählt: *Pichia* spezies, *Hansenula* spezies wie z.B. *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces* spezies, *Schizosaccharomyces* spezies, *Yarrowia* spezies wie z.B. *Yar-*

rowia lipolytica, Kluyveromyces spezies und Aspergillus spezies. Besonders bevorzugt ist erfindungsgemäß, wenn *Pichia pastoris* als Wirtszelle verwendet wird.

Als vorteilhaft hat sich für das erfindungsgemäße Verfahren ferner herausgestellt, wenn die Wirtszelle mit einer für die zymogene Vorstufe kodierende DNA transformiert wird und die Proteinase K zu einem späteren Zeitpunkt während oder unmittelbar nach der Sekretion in das Kulturmedium autokatalytisch aktiviert wird.

Bei Verwendung von *Pichia pastoris* als Wirtszelle, wird das für die zymogene Vorstufe der Proteinase K kodierende Gen bevorzugt in folgende Vektoren kloniert: pPICZ, pPICZ $\alpha$ , pGAPZ, pGAPZ $\alpha$ , pPICZ $\alpha$ A und pPIC9K. Besonders bevorzugt sind in diesem Fall die Vektoren: pPICZ $\alpha$ A und pPIC9K. Insbesondere bevorzugt ist erfindungsgemäß der Vektor pPICZ $\alpha$ A. Die vorstehend genannten Vektoren sind kommerziell erhältlich (Invitrogen).

Weiterhin ist gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von rekombinanter Proteinase K bevorzugt, wenn die Expression der Proteinase K bzw. deren zymogene Vorstufe der Proteinase K durch Methanol (pPIC-Vektoren) induziert wird. Eine andere Möglichkeiten ist die Induzierung der Expression durch Glycerinaldehydphosphat (pGAP-Vektoren).

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von rekombinanter Proteinase K wird die Sekretion des Proteins bevorzugt durch die N-terminale Fusionierung des Signalpeptides des  $\alpha$ -Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* eingeleitet. Das bedeutet beispielsweise bei den oben genannten Vektoren, die mit  $\alpha$  gekennzeichnet sind, daß diese die Nukleotidsequenz für das Signalpeptid des  $\alpha$ -Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* besitzen. Bei der Translation wird dann ein Fusions-Protein aus Signalpeptid am N-Terminus und Zielprotein erzeugt. Ein weiteres mögliches Signalpeptid wäre die natürliche Signalsequenz der Proteinase K.

Als besonders bevorzugt hat sich ferner erwiesen, wenn zur Herstellung der rekombinanten Proteinase K die Wirtszelle *Pichia pastoris* mit dem Expressionsvektoren pPICZ $\alpha$ A und pPIC9K, welche eine für die zymogene Vorstufe kodierende DNA enthalten, transformiert wird und das Gen unter Kontrolle des AOX1-Promotors und gegebenenfalls des AOX1-Terminators steht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls ein Vektor enthaltend eine für die zymogene Vorstufe der Proteinase K kodierende DNA, wobei diese stromaufwärts der kodierenden Sequenz

mit einer Sequenz im Leserahmen fusioniert ist, welche für ein geeignetes Signalpeptid kodiert und wobei das kodierende Gen unter Kontrolle eines für die Wirtszelle geeigneten Promotors und gegebenenfalls Terminators steht und wobei dieser Vektor für die Transformation dieser Wirtszelle geeignet ist. Erfundungsgemäß ist die Wirtszelle Hefe.

Gegenstand der Erfindung ist somit ferner ein rekombinanter Vektor, der eine oder mehrere Kopien der vorstehend definierten rekombinanten DNA enthält. Der Vektor ist bevorzugt ein Plasmid, welches einen für die Wirtszelle starken Promotor und ein für die Wirtszelle geeignetes Signalpeptid zur Sekretion von Proteinen besitzt. Denkbar ist aber darüber hinaus die Fusion des nativen Signalpeptides der Präproproteinase K an den N-Terminus des Propeptides, wie es in SEQ. ID. NO.: 21 (Signalsequenz 1-15 (15 Aminosäuren); Prosequenz 16-104 (90 Aminosäuren); Sequenz der reifen Proteinase K 106-384 (279 Aminosäuren)) dargestellt ist. Zur Herstellung des Expressionsvektors werden Methoden verwendet, die dem Fachmann geläufig sind und zum Beispiel bei Sambrook et al. (1989) beschrieben sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle transformiert mit einem der oben aufgeführten Vektoren, wobei die Wirtszelle eine Hefe ist. Bevorzugterweise wird die Wirtszelle ausgewählt aus der folgenden Gruppe: Pichia spezies, Hansenula spezies wie z.B. Hansenula polymorpha, Saccharomyces spezies, Schizosaccharomyces spezies, Yarrowia spezies wie z.B. Yarrowia lipolytica, Kluyveromyces spezies. und Aspergillus spezies. Besonders bevorzugt ist als Wirtszelle Pichia pastoris. Insbesondere ist bevorzugt, wenn mehrere Vektoren (mit jeweils einer Kopie des *ppK*-Gens) in das Genom integriert werden.

Ferner umfaßt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Reinigung der Proteinase K. Für die Aufreinigung der Protease werden in einem ersten Schritt die Hefezellen über Mikrofiltration bzw. Zentrifugation entfernt. Die resultierende klare Lösung enthält die Protease. Anschließend folgt eine Umpufferung über Ultrafiltration, um das Produkt an einen Kationenaustauscher, beispielsweise SP-Sepharose oder SP-Sephadex (Pharmacia) oder SP-Toyopearl (Tosoh Corporation) zu binden. Nach der Elution erfolgt eine erneute Umpufferung über Ultrafiltration und die Bindung an einen Anionenaustauscher, beispielsweise DEAE-Sepharose oder Q-Sepharose (Pharmacia) oder DEAE-Fraktogel (Merck). Nach der erneuten Elution wird die reine Protease über Ultrafiltration in ein stabiles Puffersystem überführt (Protein Purification, Principles and Practice, Robert K. Scopes, Springer Verlag, 1982). Der Fachmann kann jedoch auch andere Methoden zur Reinigung verwenden, die zum Stand der Technik gehören.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es überraschenderweise gelungen, rekombinante Proteinase K herzustellen, wobei das Enzym löslich und aktiv von einer heterologen Wirtszelle produziert wird. Bei der Expression der Proteinase K mit anschließender Sekretion des Enzyms in das Kulturmedium ist insbesondere von Vorteil, daß verhindert wird, daß die Proteinase K im Cytosol der Wirtszelle eine stark toxische Wirkung entfaltet. Weiterhin wird die korrekte Ausbildung der zwei Disulfidbrücken gewährleistet, die im reduzierenden Milieu des Cytosols auch nicht ohne weiteres stattfinden könnte. Somit ist ein entscheidender Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens, daß ein Weg für die lösliche und aktive Produktion einer rekombinanten Proteinase K bereitgestellt wird. Es ist sehr überraschend und nicht erklärlich, daß die Oberflächenproteine der erfindungsgemäßen Wirtszellen durch eine sekretierte Proteinase K nicht hydrolysiert werden. Bei der zu erwartenden Hydrolyse der Oberflächenproteine durch Proteinase K würde die Wirtszelle in ihrem Lebenszyklus gestört.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird eine Proteinase K erhalten, welche homogen ist und daher in besonderem Maße für analytische und diagnostische Anwendungen geeignet ist. Die erfindungsgemäße zymogene Vorstufe der Proteinase K kann gegebenenfalls weitere N-terminale Modifikationen enthalten, und zwar insbesondere Sequenzen, die eine Reinigung des Zielproteins erleichtern ("affinity tags"). Ferner kann die zymogene Vorstufe Sequenzen enthalten, welche die Effizienz der Translation erhöhen, welche die Faltungseffizienz steigern und/oder auch solche Sequenzen, die zu einer Sekretion des Zielproteins in das Kulturmedium führen (natürliche Präsequenz und andere Signalpeptide).

Unter Proteinase K im Sinne der Erfindung sind sowohl die in SEQ. ID. NO.: 1 angegebene Sequenz nach Gassen et al. (1989), als auch andere Varianten der Proteinase K aus *Tritirachium album Limber*, wie die in Ch. Betzel et al. (Biochemistry 40 (2001), 3080-3088) offenbarte Aminosäuresequenz sowie insbesondere Proteinase T (Samal, B.B. et al. (1989) Gene Vol. 85(2), 329-333; Samal, B.B. et al. (1996) Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 379, 95-104) und Proteinase R (Samal, B.B. et al. (1990) Mol. Microbiol. Vol. 4(10), 1789-1792; US 5,278,062) und darüber hinaus mit rekombinanten Mitteln erzeugte Varianten (wie zum Beispiel in der WO 96/28556 beschrieben) zu verstehen. SEQ. ID. NO.: 1 umfaßt eine Prosequenz (1-90; 90 Aminosäuren) und die Sequenz der reifen Proteinase K (91-368; 279 Aminosäuren). Die von Betzel et al. (Biochemistry 40 (2001), 3080-3088) beschriebene Proteinase-K-Aminosäuresequenz weist insbesondere in Position 207 der aktiven Protease Aspartat anstatt eines Serintestes auf.

Pro-Proteinase K im Sinne der Erfindung bedeutet insbesondere eine Proteinase K, die am N-Terminus mit ihrer Prosequenz gemäß SEQ. ID. NO.: 1 verknüpft ist. Bei dem mit Proteinase K eng verwandten Subtilisin E und entsprechenden Varianten hat die Prosequenz einen essentiellen Einfluß auf die Faltung und Bildung von aktiver Protease (Ikemura, H. et al. (1987) *Biol. Chem.* Vol. 262(16), 7859-7864). Es wird insbesondere vermutet, daß die Prosequenz als intramolekulares Chaperon wirkt (Inouye, M. (1991) *Enzyme* Vol. 45, 314-321). Nach der Faltung findet die Prozessierung zur reifen Subtilisin-Protease statt, indem das Propeptid autokatalytisch abgespalten wird (Ikemura, H. und Inouye, M. (1988) *J. Biol. Chem.* Vol. 263(26), 12959-12963). Dieser Prozeß findet bei Subtilisin E (Samal, B.B. et al. (1989) *Gene* Vol. 85(2), 329-333; Volkov, A. und Jordan, F. (1996) *J. Mol. Biol.* Vol. 262, 595-599), Subtilisin BPN' (Eder, J. et al. (1993) *Biochemistry* Vol. 32, 18-26), Papain (Vernet, T. et al. (1991) *J. Biol. Chem.* Vol. 266(32), 21451-21457) und Thermolysin (Marie-Claire, C. (1998) *J. Biol. Chem.* Vol. 273(10), 5697-5701) intramolekular statt.

Für die Funktion als Chaperon scheinen nur bestimmte, meist hydrophobe Kernbereiche der Prosequenz notwendig zu sein, da Mutationen in weiten Bereichen ohne Einfluß auf die Aktivität bleiben (Kobayashi, T. und Inouye, M. (1992) *J. Mol. Biol.* Vol. 226, 931-933). Außerdem ist bekannt, daß Propeptide zwischen verschiedenen Subtilisinvarianten austauschbar sind. So erkennt zum Beispiel Subtilisin BPN' auch die Prosequenz von Subtilisin E (Hu, Z. et al. (1996) *J. Biol. Chem.* Vol. 271(7), 3375-3384).

Die vorliegende Erfindung umfaßt somit sowohl die 90 Aminosäuren lange Prosequenz nach SEQ. ID. NO.: 1, als auch andere Varianten, die eine faltungsfördernde Funktion erfüllen. Ebenfalls umfaßt ist ein Propeptid, das exogen zu der Faltung von reifer Proteinase K gegeben wird und die oben ausführten Funktionen erfüllt.

Der wesentliche Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist daher, daß die rekombinante Proteinase K löslich und aktiv von einem Expressionswirt in das Kulturmedium sekretiert wird. Darüber hinaus wird der bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Expressionswirt durch die sehr aktive und unspezifische Protease nicht geschädigt oder in sonstiger Weise negativ beeinflußt, d.h. insbesondere, daß das Wachstum weiter problemlos erfolgt und eine verstärkte Zell-Lyse nicht zu beobachten ist. Zudem ist der erfindungsgemäße Expressionswirt im Vergleich zu *Tritirachium album* leichter handhabbar und zeichnet sich durch höhere Wachstumsraten aus.

## Figurenbeschreibung

### Figur 1

Expressionsplasmid pPICPK-1. Eine für die zymogene Proform der Proteinase K kodierende Sequenz kloniert in den Ausgangsvektor pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen).

### Figur 2

Expressionsplasmid pPICPK-2. Eine für die zymogene Proform der Proteinase K kodierende Sequenz kloniert in den Ausgangsvektor pPIC9K (Invitrogen).

## Beispiele

### Beispiel 1

#### *Gensynthese*

Das Gen für die reife Proteinase K aus *Tritirachium album Limber* ohne Signalsequenz und ohne Intron wurde mittels Gensynthese generiert. Als Vorlage wurde die 368 Aminosäuren lange Sequenz (ohne natives Signalpeptid) von Gunkel und Gassen, 1989 verwendet. Durch Rücktransliteration der Aminosäuresequenz wurde eine für die Expression sowohl in *E.coli* wie auch Hefe codon-optimierte Nukleinsäuresequenz erstellt. Die Aminosäuresequenz ist in SEQ. ID. NO.: 1, die Nukleotidsequenz in SEQ. ID. NO.: 2 dargestellt.

Für die Gensynthese wurde das Gen in 18 Fragmente aus Sinn- und reversen, komplementären Gegenstrangoligonukleotiden in alternierender Folge unterteilt (SEQ. ID. NO.: 3-20). Am 5'- und 3'-Ende wurde jeweils ein mindestens 15 bp- langer Bereich angehängt, der jeweils mit den benachbarten Oligonukleotiden überlappt. An die 5'- und 3'-Enden des synthetischen Gens wurden außerhalb des codierenden Bereichs zur späteren Klonierung in Expressionsvektoren Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen angehängt. Für die Klonierung des pro-Proteinase K-Gens wurde als 5'-Primer das in SEQ. ID. NO.: 3 dargestellte Oligonukleotid verwendet, das eine EcoRI-Schnittstelle enthält. SEQ. ID. NO.: 20 zeigt den 3'-Primer mit HindIII-Schnittstelle. Der 3'-Primer enthält ein zusätzliches Stoppcodon nach dem natürlichen Stoppcodon, um eine gesicherte Termination der Translation zu gewährleisten.

Die Oligonukleotide wurden mittels PCR-Reaktion miteinander verknüpft und das daraus resultierende Gen amplifiziert. Dabei wurde das Gen zunächst in drei Fragmente zu je 6 Oligonukleotiden unterteilt und in einem zweiten PCR-Zyklus die drei Teilstücke miteinander verknüpft.

Fragment 1 setzt sich aus den Oligonukleotiden wie in SEQ. ID. NO.: 3-8 dargestellt, Fragment 2 aus Oligonukleotide wie in SEQ. ID. NO.: 9-14 dargestellt und Fragment drei aus Oligonukleotid wie in SEQ. ID. NO.: 15-20 dargestellt, zusammen.

Folgende PCR-Parameter wurden angewandt:

PCR-Reaktion 1 (Generierung der drei Teilstücke)

5 min	95°C	hotstart
2 min	95°C	
2 min	42°C	30 Zyklen
1,5 min	72°C	
7 min	72°C	

PCR-Reaktion 2 (Verknüpfung der Teilstücke zum Gesamtgen)

5 min	95°C	hotstart
1,5 min	95°C	
2 min	48°C	6 Zyklen (ohne endständige Primer)
2 min	72°C	

Zugabe der endständigen Primer

1,5 min	95°C	
1,5 min	60°C	25 Zyklen (mit endständigen Primern)
2 min	72°C	
7 min	72°C	

Beispiel 2

*Klonierung des synthetischen Proteinase K-Fragmentes aus der Gensynthese*

Der PCR-Ansatz wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und das ca. 1130 Bp große PCR-Fragment wurde aus dem Agarosegel (Geneclean II Kit von Bio 101, Inc. CA USA) isoliert. Das Fragment wurde mit den EcoRI- und HindIII-Restriktionsendonukleasen (Roche Diagnostics GmbH, Germany) 1 Stunde bei 37°C geschnitten. Gleichzeitig wurde das pUC18-Plasmid (Roche Diagnostics GmbH, Germany) mit den EcoRI- und HindIII-Restriktionsendonukleasen 1 Stunde bei 37°C geschnitten, der Ansatz mittels Agaroseelektrophorese aufgetrennt und das 2635 Bp große Vektorfragment isoliert. Anschließend wurden das PCR-Fragment und das Vektorfragment mittels T4-DNA-Ligase miteinander ligiert. Dazu wurden 1 µl (20 ng) Vektorfragment und 3 µl (100 ng) PCR-Fragment, 1

$\mu$ l 10 x Ligase-Puffer (Maniatis et al., 1989 B.27), 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase, 4  $\mu$ l steriles H<sub>2</sub>O bidest. pipettiert, vorsichtig gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

Das klonierte Gen wurde mittels Restriktionsanalyse und durch mehrfache Sequenzierung beider Stränge untersucht.

### Beispiel 3

#### *Vektorkonstruktion*

Das synthetische Gen mußte zunächst wieder aus dem pUC-Plasmid isoliert werden. Zu diesem Zweck wurden 1  $\mu$ g Plasmid-DNA zunächst mit der Restriktionsendonuklease HindIII (Roche Diagnostics GmbH) nach den Herstellerangaben inkubiert und anschließend die Restriktionsendonuklease durch Erwärmung auf 65°C für 20 min inaktiviert. Anschließend wurden dabei entstehenden DNA-Überhänge mit Klenow-Polymerase nach Herstellerangaben (Roche Diagnostics GmbH) aufgefüllt und die Klenow-Polymerase dann durch Inkubation bei 75°C für 10 min inaktiviert. Zuletzt wurde das nun linearisierte Vektorfragment des o.a. pUC-Plasmides mit der Restriktionsendonuklease EcoRI (Roche Diagnostics GmbH) nach den Herstellerangaben geschnitten, der Restriktionsansatz auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die Fragmente der Größe nach durch Anlegen von Strom (100 V/ 150 mA) voneinander getrennt. Das ca. 1120 bp große Fragment, enthaltend das Gen für die Proproteinase K (*ppk*-Gen) wurde aus dem Agarosegel isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen).

Der Vektor pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen) wurde mit der Restriktionsendonuklease Asp718I (Roche Diagnostics GmbH) nach den Herstellerangaben geschnitten und Restriktionsendonuklease durch Erwärmung des Inkubationsansatzes auf 65°C für 20 min inaktiviert. Anschließend wurden dabei entstehenden DNA-Überhänge mit Klenow-Polymerase nach Herstellerangaben (Roche Diagnostics GmbH) aufgefüllt und die Klenow-Polymerase dann durch Inkubation bei 75°C für 10 min inaktiviert. Zuletzt wurde das nun linearisierte Vektorfragment von pPICZ $\alpha$ A mit der Restriktionsendonuklease EcoRI (Roche Diagnostics GmbH) nach den Herstellerangaben geschnitten, der Restriktionsansatz auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die Fragmente der Größe nach durch Anlegen von Strom (100 V/ 150 mA) voneinander getrennt. Das ca. 3550 bp große Vektorfragment wurde aus dem Agarosegel isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen).

Die so gewonnenen Fragmente wurden nach Standardmethode (Sambrook et al. 1989) miteinander ligiert. In diesem Vektor steht das *ppk*-Gen unter Kontrolle des AOX 1-Promotors (Promotor für die Alkoholoxidase 1 aus *Pichia pastoris*, mit Methanol induzierbar) und wird mit dieser Klo-

nierungsstrategie im korrekten Leserahmen hinter das Signalpeptid des  $\alpha$ -Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* kloniert. Das so insertierte Genfragment wurde dann mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf fehlerfreie Basensequenz untersucht. Der so entstandene Expressionsvektor, der das *ppk*-Gen, das für die Proproteinase K kodiert, enthält, wurde pPICPK-1 (s. Fig. 1) genannt.

Anschließend wurde das *ppk*-Gen ebenfalls in pPIC9K (Invitrogen) kloniert. Dazu wurde der Vektor pPICPK-1 mit den Restriktionsendonukleasen PmeI und NotI (Roche Diagnostics GmbH) nach den Herstellerangaben geschnitten, die Fragmente aus dem Restriktionsansatz in einem 1%igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und das ca. 1960 bp große Fragment, enthaltend den 3'-Teil der AOX1-Promotor-Region, die Sequenz für das Signalpeptid des  $\alpha$ -Faktors und das *ppk*-Gen, aus dem Gel isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen). Gleichzeitig wurde der Vektor pPIC9K mit den Restriktionsendonukleasen PmeI und NotI (Roche Diagnostics GmbH) nach den Herstellerangaben geschnitten, die Fragmente aus dem Restriktionsansatz in einem 1%igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und das ca. 8450 bp große Vektorfragment aus dem Gel isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit/Qiagen).

Anschließend wurden die so gewonnenen Fragmente nach Standardmethode (Sambrook et al. 1989) miteinander ligiert. In diesem Vektor steht das *ppk*-Gen ebenfalls unter Kontrolle des AOX 1-Promotors (Promotor für die Alkoholoxidase 1 aus *Pichia pastoris*, mit Methanol induzierbar). Der Vektor pPIC9K unterscheidet sich von dem Vektor pPICZ $\alpha$ A durch den Selektionsmarker und durch drei dem Fachmann bekannten Integrationsmöglichkeit in das *Pichia* Genom je nach Vektorlinearisierung vor der Transformation während die Integration von pICZ $\alpha$ A in den AOX1-Locus festgelegt ist. Das insertierte Genfragment wurde dann mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf fehlerfreie Basensequenz untersucht.

Der so entstandene Expressionsvektor, der das *ppk*-Gen, das für die Proproteinase K kodiert, enthält, wurde pPICPK-2 (s. Fig. 2) genannt.

#### Beispiel 4

##### *Transformation von pPICPK-1 in Pichia pastoris*

Zur Transformation von pPICPK-1 in *Pichia pastoris* X-33 mit anschließender Integration in das Genom wurde der Vektor zunächst mit PmeI (Roche Diagnostics GmbH) linearisiert. Die Transformation wurde mittels Elektroporation mit dem Gene Pulser II (Biorad) durchgeführt.

Dazu wurde eine Kolonie von *Pichia pastoris* Wildtypstamm in 5 ml YPD-Medium (nach Invitrogen-Katalog) angeimpft und bei 30°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtungskultur wurde anschließend 1:2000 in 200 ml frisches YPD-Medium (nach Invitrogen-Katalog) überimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 1,3 – 1,5 erreicht war. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1500 x g / 5 Minuten) und das Pellet in 200 ml eiskaltem, sterilen Wasser (0°C) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert (1500 x g/5 Minuten) und in 100 ml eiskaltem, sterilen Wasser (0°C) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert, in 10 ml eiskaltem (0°C) 1 M Sorbitol (ICN) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert, in 0,5 ml eiskaltem (0°C) 1 M Sorbitol (ICN) resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen wurden auf Eis gehalten und sofort zur Transformation eingesetzt.

80 µl der Zellen wurden mit ca. 1 µg linearisierter pPICPK-1-Vektor-DNA versetzt und der gesamte Ansatz in eine eiskalte (0°C) Elektroporationsküvette transferiert und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Küvette in den Gene Pulser II (Biorad) überführt und die Transformation bei 1 kV, 1 kΩ und 25µF durchgeführt. Nach der Elektroporation wurde der Ansatz mit 1 ml 1M Sorbitol (ICN) versetzt und anschließend 100 – 150 µl auf eine YPDS-Agarplatte (nach Invitrogen-Katalog) mit 100µg/ml Zeocin® (Invitrogen) ausplattiert. Die Platten wurden anschließend 2 – 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die Klone wurden auf Raster-MD (= minimal Dextrose)-Platten überimpft und weiter analysiert.

Gewachsene Klone wurden gepickt, in 20 µl steriles Wasser resuspendiert, mit 17,5 U Lyticase (Roche Diagnostics GmbH) aufgeschlossen (1 Stunde, 37°C) und direkt mittels PCR auf die korrekte Integration der *ppk*-Expressionskassette untersucht.

Klone, die die komplette Expressionskassette bei der Transformation in das Genom integriert haben, wurden dann in Expressionsversuchen eingesetzt.

#### Beispiel 5

##### *Transformation von pPICPK-2 in Pichia pastoris*

Zur Transformation von pICPK-2 in *Pichia pastoris* GS115 mit anschließender Integration in das Genom wurde der Vektor zunächst für Variante I mit PmeI (Roche Diagnostics GmbH) zur Integration in den AOX1-Locus und für Variante II mit Sall (Roche Diagnostics GmbH) zur Inte-

gration in den His4-Locus linearisiert. Die Transformation wurde mittels Elektroporation mit dem Gene Pulser II (Biorad) durchgeführt.

Dazu wurde eine Kolonie von *Pichia pastoris* GS115 Wildtypstamm in 5 ml YPD-Medium (nach Invitrogen-Katalog) angeimpft und bei 30°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtkultur wurde anschließend 1:2000 in 200 ml frisches YPD-Medium (nach Invitrogen-Katalog) überimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 1,3 – 1,5 erreicht war. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1500 x g / 5 Minuten) und das Pellet in 200 ml eiskaltem, sterilen Wasser (0°C) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert (1500 x g/5 Minuten) und in 100 ml eiskaltem, sterilen Wasser (0°C) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert, in 10 ml eiskaltem (0°C) 1 M Sorbitol (ICN) resuspendiert. Die Zellen wurden wiederum abzentrifugiert, in 0,5 ml eiskaltem (0°C) 1 M Sorbitol (ICN) resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen wurden auf Eis gehalten und sofort zur Transformation eingesetzt.

80 µl der Zellen wurden mit ca. 1 µg linearisierter pICPK-2-Vektor-DNA versetzt und der gesamte Ansatz in eine eiskalte (0°C) Elektroporationsküvette transferiert und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Küvette in den Gene Pulser II (Biorad) überführt und die Transformation bei 1 kV, 1 kΩ und 25 µF durchgeführt. Nach der Elektroporation wurde der Ansatz mit 1 ml 1M Sorbitol (ICN) versetzt und anschließend 100 – 150 µl auf eine MM-Agarplatte (Minimalmedium nach Invitrogen-Katalog) ohne Histidin ausplattiert. Die Platten wurden anschließend 2 – 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Klone von *Pichia pastoris* GS115, die durch Mutation ein defektes His4-Gen (Histidinoldehydrogenase) besitzen, können auf diesen Platten nur wachsen, wenn Sie den Vektor pICPK-2 integriert haben, der das funktionsfähige His4-Gen als Insert besitzt und somit die Defizienz in der Histidinbiosynthese aufhebt.

Die Klone wurden auf Raster-MD (= minimal Dextrose)-Platten überimpft und weiter analysiert. Gewachsene Klone wurden gepickt, in 20 µl steriles Wasser resuspendiert, mit 17,5 U Lyticase (Roche Diagnostics GmbH) aufgeschlossen (1 Stunde, 37°C) und direkt mittels PCR auf die korrekte Integration der *ppk*-Expressionskassette untersucht.

Klone, die die komplette Expressionskassette bei der Transformation in das Genom integriert haben, wurden dann in Expressionsversuchen eingesetzt.

**Beispiel 6***Expression der Proteinase K*

Positive Klone wurden in 10 ml BMGY-Medium (nach Invitrogen-Katalog) angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die OD bei 600 nm bestimmt und so in 10ml BMMY-Medium (nach Invitrogen-Katalog) überimpft, daß eine OD<sub>600</sub> von 1 resultierte. Das BMMY-Medium (nach Invitrogen-Katalog) enthält Methanol (Mallinckrodt Baker B.V.), das die Expression der Proteinase K über den AOX 1-Promotor induziert.

Die Schüttelkolben wurden bei 30°C unter Schütteln inkubiert, alle 24 Stunden Proben gezogen, die OD<sub>600</sub> bestimmt, ein Aktivitätstest auf Expression der Proteinase K durchgeführt und jeweils mit 0,5% Methanol (Mallinckrodt Baker B.V.) zur weiteren Induktion nachgefüttert. Die Expressionsversuche liefen über 168 Stunden.

**Beispiel 7***Aktivitätstest der sekretierten rekombinanten Proteinase K*

Für den Aktivitätstest der rekombinanten Proteinase K benötigt man CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Merck ID-Nr. 102382), DMSO (Merck ID-Nr. 109678), das Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Roche Diagnostics ID-Nr. 0716766) und Tris-Base (Roche Diagnostics ID-Nr. 0153265).

Die Lösungen setzen sich wie folgt zusammen:

Lösung 1: 50 mmol/l Tris-Base; 10 mmol/l CaCl<sub>2</sub> pH 8,2

Lösung 2: 125 mg Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA in 1 ml DMSO gelöst

Die Zellen werden abzentrifugiert (5 min 10000 rpm Eppendorf-Tischzentrifuge) und der Überstand 1:500 in Lösung 1 verdünnt.

2 ml von Lösung 1 werden in eine Küvette pipettiert und mit 0,02 ml von Lösung 2 versetzt. Die beiden Lösungen werden vermischt und auf die Reaktionstemperatur von 25°C temperiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,05 ml des wie o.a. verdünnten Überstandes und nochmaligen Mischen gestartet, die Absorptionsänderung bei 405 nm gemessen und das ΔA/min aus dem linearen Bereich gemessen. Die Auswertung erfolgt dann nach folgender Formel:

2,07

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta A/\text{min}}{\epsilon \times 1 \times 0,05} [\text{U/ml Probe-Lösung}]$$

2,07 = Probevolumen

$\epsilon_{405} = 10,4 \text{ [mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}]$

1 = Schichtdicke der Küvette

0,05 = Volumen der zugegebenen Probe

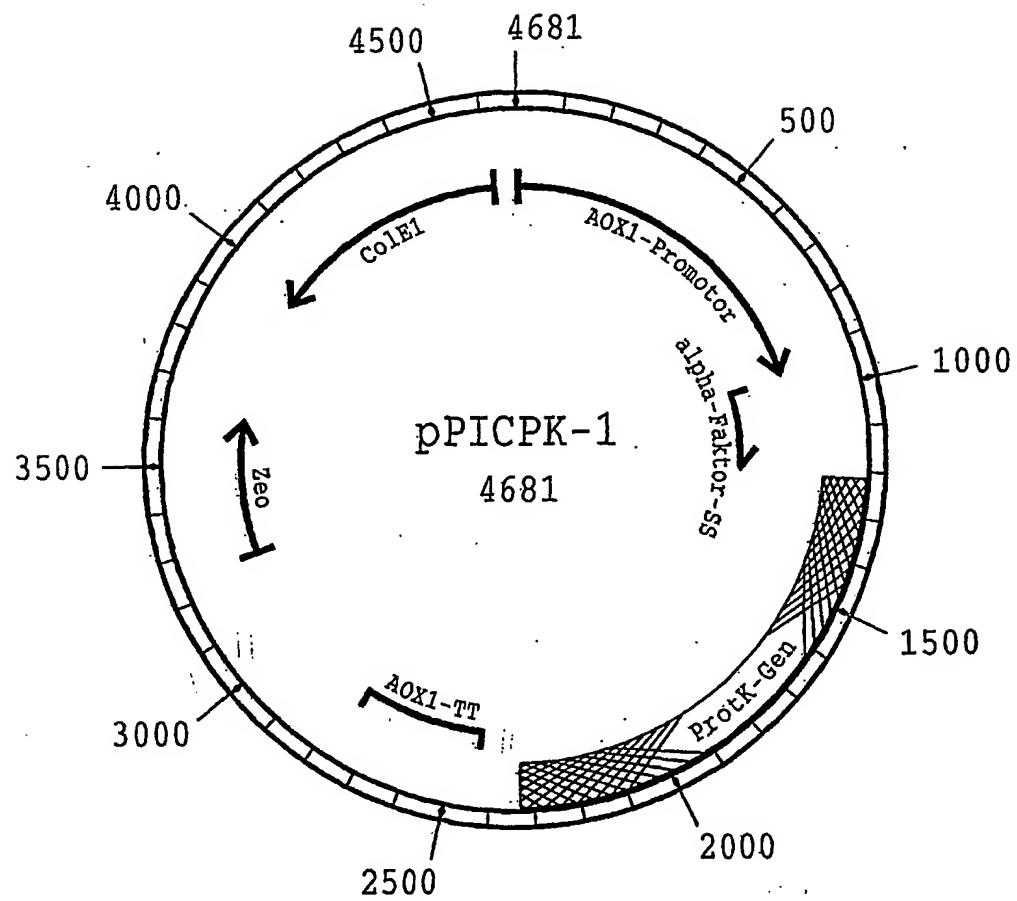
**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von rekombinanter Proteinase K umfassend die Schritte
  - a) Transformation einer Wirtszelle mit einem Vektor enthaltend eine für die zymogene Vorstufe der Proteinase K kodierende DNA, wobei diese stromaufwärts der kodierenden Sequenz mit einer Sequenz im Leserahmen fusioniert ist, welche für ein Signalpeptid kodiert und unter Kontrolle eines für die Wirtszelle geeigneten Promotors steht,
  - b) Expression der zymogenen Vorstufe der Proteinase K,
  - c) Sekretion und autokatalytische Aktivierung der Proteinase K,  
dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Wirtszelle um Hefezellen handelt und das Protein löslich von diesem Expressionswirt sekretiert wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Wirtszelle ausgewählt ist aus der folgenden Gruppe: *Pichia* sp., *Hansenula* sp., *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Yarrowia* sp., *Kluyveromyces* sp. und *Aspergillus* sp.
3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei es sich bei der Wirtszelle um *Pichia pastoris* handelt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei das Gen, das für die zymogene Vorstufe der Proteinase K kodiert in einen der folgenden Vektoren kloniert wird: pPICZ, pPICZ $\alpha$ , pGAPZ, pGAPZ $\alpha$ , pPICZ $\alpha$ A und pPIC9K.
5. Verfahren gemäß Anspruch 3 oder 4, wobei die Wirtszelle mit einem der folgenden Vektoren transformiert wird: pPICPK-1 und pPICPK-2.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Expression der zymogenen Vorstufe der Proteinase K durch Methanol induziert wird.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Sekretion des Proteins durch die N-terminale Fusionierung eines Signalpeptides eingeleitet wird

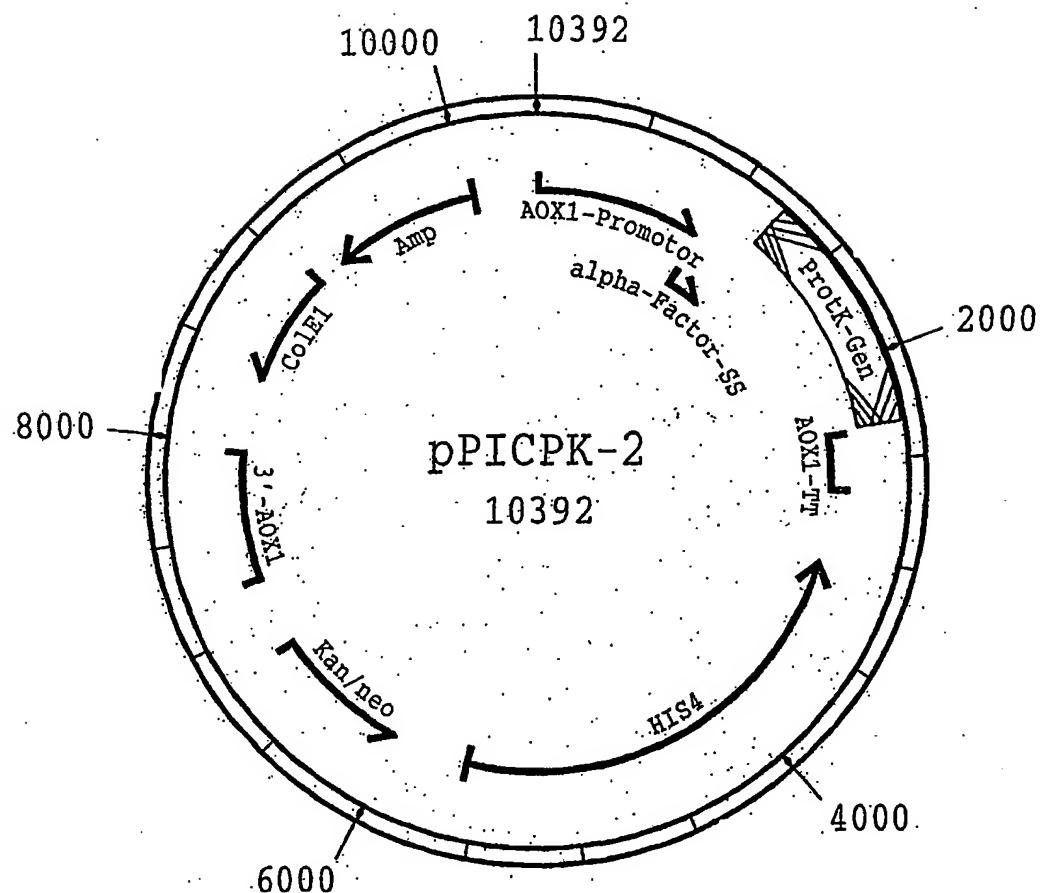
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Sekretion des Proteins durch die N-terminale Fusionierung eines Signalpeptides des  $\alpha$ -Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* eingeleitet wird
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Wirtszelle *Pichia pastoris* mit dem Expressionsvektor pPICZ $\alpha$ A, welcher eine für die zymogene Vorstufe der Proteinase K kodierende DNA enthält, transformiert wird und das Gen unter Kontrolle des AOX1-Promotors steht.
10. Vektor enthaltend eine für die zymogene Vorstufe der Proteinase K kodierende DNA, wobei diese DNA stromaufwärts der kodierenden Sequenz mit einer Sequenz im Leserahmen fusioniert ist, welche für ein geeignetes Signalpeptid kodiert, und das kodierende Gen unter Kontrolle eines für die Wirtszelle geeigneten Promotors steht und dieser Vektor für die Transformation von Hefe geeignet ist.
11. Vektor gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er für die Transformation von *Pichia pastoris* geeignet ist.
12. Vektor enthaltend eine für eine zymogene Vorstufe der Proteinase K kodierende DNA gemäß Anspruch 10 oder 11 ausgewählt aus der folgenden Gruppe: pPICZ, pPICZ $\alpha$ , pGAPZ, pGAPZ $\alpha$ , pPICZ $\alpha$ A und pPIC9K.
13. Vektor gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei der Vektor pPICZ $\alpha$ A ist.
14. Vektor gemäß einem der Ansprüche 10-12, wobei der Vektor enthaltend eine für die zymogenen Vorstufe der Proteinase K kodierende DNA pPICPK-1 oder pPICPK-2 ist.
15. Wirtszelle transformiert mit einem Vektor gemäß einem der Ansprüche 10-14 wobei die Wirtszelle eine Hefe ist.
16. Wirtszelle gemäß Anspruch 15, wobei die Wirtszelle ausgewählt ist aus der folgenden Gruppe: *Pichia* sp., *Hansenula* sp., *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Yarrowia* sp., *Kluyveromyces* sp. und *Aspergillus* sp.

17. Wirtszelle gemäß Anspruch 15 oder 16, wobei die Wirtszelle *Pichia pastoris* ist.

Figur 1



Figur 2



## SEQUENCE LISTING

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Expression der rekombinanten Proteinase K aus  
Tritirachium album in Hefe

<130> 5441/00/DE

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 369

<212> PRT

<213> Tritirachium album Limber

<400> 1

Ala Pro Ala Val Glu Gln Arg Ser Glu Ala Ala Pro Leu Ile Glu Ala  
1 5 10 15

Arg Gly Glu Met Val Ala Asn Lys Tyr Ile Val Lys Phe Lys Glu Gly  
20 25 30

Ser Ala Leu Ser Ala Leu Asp Ala Ala Met Glu Lys Ile Ser Gly Lys  
35 40 45

Pro Asp His Val Tyr Lys Asn Val Phe Ser Gly Phe Ala Ala Thr Leu  
50 55 60

Asp Glu Asn Met Val Arg Val Leu Arg Ala His Pro Asp Val Glu Tyr  
65 70 75 80

Ile Glu Gln Asp Ala Val Val Thr Ile Asn Ala Ala Gln Thr Asn Ala  
85 90 95

Pro Trp Gly Leu Ala Arg Ile Ser Ser Thr Ser Pro Gly Thr Ser Thr  
100 105 110

Tyr Tyr Tyr Asp Glu Ser Ala Gly Gln Gly Ser Cys Val Tyr Val Ile  
115 120 125

Asp Thr Gly Ile Glu Ala Ser His Pro Glu Phe Glu Gly Arg Ala Gln  
130 135 140

Met Val Lys Thr Tyr Tyr Ser Ser Arg Asp Gly Asn Gly His Gly  
145 150 155 160

Thr His Cys Ala Gly Thr Val Gly Ser Arg Thr Tyr Gly Val Ala Lys  
165 170 175

Lys Thr Gln Leu Phe Gly Val Lys Val Leu Asp Asp Asn Gly Ser Gly  
180 185 190

Gln Tyr Ser Thr Ile ~~Val~~ ~~Ala~~ Gly Met Asp Phe Val Ala Ser Asp Lys  
 195 200 205

Asn Asn Arg Asn Cys Pro ~~Lys~~ Gly Val Val Ala Ser Leu Ser Leu Gly  
 210 215 220

Gly Gly Tyr Ser Ser Val Asn Ser Ala Ala Ala Arg Leu Gln Ser  
 225 230 235 240

Ser Gly Val Met Val Ala Val Ala Ala Gly Asn Asn Asn Ala Asp Ala  
 245 250 255

Arg Asn Tyr Ser Pro Ala Ser Glu Pro Ser Val Cys Thr Val Gly Ala  
 260 265 270

Ser Asp Arg Tyr Asp Arg Arg Ser Ser Phe Ser Asn Tyr Gly Ser Val  
 275 280 285

Leu Asp Ile Phe Gly Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr Trp Ile Gly  
 290 295 300

Gly Ser Thr Arg Ser Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val  
 305 310 315 320

Ala Gly Leu Ala Ala Tyr Leu Met Thr Leu Gly Lys Thr Thr Ala Ala  
 325 330 335

Ser Ala Cys Arg Tyr Ile Ala Asp Thr Ala Asn Lys Gly Asp Leu Ser  
 340 345 350

Asn Ile Pro Phe Gly Thr Val Asn Leu Leu Ala Tyr Asn Asn Tyr Gln  
 355 360 365

Ala

<210> 2  
 <211> 1124  
 <212> DNA  
 <213> Tritirachium album Limber

<400> 2  
 gaattcgctc ctgccgttga gcagcgctcc gaggctgctc ctctgatcga ggcccgccggc 60  
 gagatgggtt ccaacaagta catcgtaag ttcaaggagg gtagcgctct ttcccgctctg 120  
 gatgctgcca tggagaagat ctctggcaag cccgaccacg tctacaagaa cgtttcaga 180  
 ggttgcgtcg cgacccttggc cgagaacatg gttcgggttc tccgcgcccc ccccgatgtt 240  
 gagtacatcg agcaggatgc tggatgcacc atcaacgtc cgacgaccaa cgctccctgg 300  
 ggcctggctc gcatactccag caccggcccc ggtacctcta cctactacta tgacgaatct 360  
 gccggccaaag gtcctcgctc ctacgtgtc gacaccggta tcgaggatc gcaccccgag 420  
 ttccgggggtc gtgcccagat ggtcaagacc tactactact ccagtcgcga cggtaacgg 480  
 cacggccaccc actgcgttgc taccgttggc tcccgatct acgtgtcgc caagaagacc 540  
 cagctgttcg gtgtcaaggt cctggatgac aacggcagtg gccagttactc caccatcatc 600  
 gccggatgg acttcgttgc cagcgacaag aacaaccgca actgccccaa aggtgtcggtt 660  
 gcctccttat ccctggccgg tggtaactcc tccctcgatc acagcgccgc tgcccgccctc 720  
 cagagctctg gtgtcatggc cggcgatcgat gccggtaaca acaacgctga cgcccgcaac 780  
 tactccctgtt cttctgagcc ctcggatctgc accgtcggtg ctctgtaccg ctacgaccgc 840  
 cgctccagct ttcacta cggcagcggtt ttggacatct tcggccctgg taccagatc 900  
 ctctccaccc ggatcgccgg cagcacccgc tccatctctg gtacactccat ggctactccc 960

cacgttgccg gtctcgctgc ctacctcatg actcttggaa agactaccgc cgccagcgct 1020  
tgccgataca ttgccgacac cgccaacaag ggcgacttaa gcaacattcc ctteggcact 1080  
gtcaacttgc ttgcctacaa caactaccag gcttaatgaa gctt 1124

<210> 3  
<211> 79  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 3  
cgcgaattcg ctccctgccgt tgagcagcgc tccgaggctg ctccctgtat cgaggcccgc 60  
ggcgagatgg ttgccaaca 79

<210> 4  
<211> 80  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 4  
atcttctcca tggcagcatac cagagcgaa agagcgctac cctccttcaa cttgacgatg 60  
tacttgttgg caaccatctc 80

<210> 5  
<211> 80  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 5  
tgccatggag aagatctctg gcaagccga ccacgtctac aagaacgtct tcagcggttt 60  
cgctgcgacc ctggacgaga 80

<210> 6  
<211> 64  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 6  
tgctcgatgt actcaacatc ggggtggcg cggagaaccc gaaccatgtt ctcgtccagg 60  
gtcg 64

<210> 7  
<211> 65  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 7  
tgagtacatc gaggcaggatg ctgttgcac catcaacgct gcgcagaccg ctgcgcagac 60  
caacg 65

<210> 8  
<211> 70  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 8  
agtagtgata ggtaccgggg ctgggtgtgg agatgcgagc caggccccag ggagcggtgg 60  
tctgcgcagc 70

<210> 9  
<211> 80  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 9  
gtacctctac ctactactat gacgaatctg ccggccaaagg ctccctgcgtc tacgtgtatcg 60  
acacccggatcg 80

<210> 10  
<211> 81  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 10  
ttaccgtcgca gactggagta gtagtaggtc ttgaccatct gggcacgacc ctcgaactcg 60  
gggtgcgtatcg cctcgataacc g 81

<210> 11  
<211> 78  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 11  
ccagtcgcga cggtaacggt cacggcaccc actgcgtgg taccgttggc tcccgatcc 60  
acggtgtcgca caagaaga 78

<210> 12  
<211> 73  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 12  
atggggagt actggccact gccgttgtca tccaggacct tgacacccgaa cagctgggtc 60  
ttcttggcga cac 73

<210> 13  
<211> 81  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 13  
ggccagttact ccaccatcat cgccggatag gacttcgttg ccagcgacaa gaacaaccgc 60  
aactggccca aagggtgtcgt t 81

<210> 14  
<211> 81  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 14  
gctctggagg cgggcagcgg cgctgttcac ggaggaggag taaccaccgc ccagggataa 60  
ggaggcaacg acacctttgg g 81

<210> 15  
<211> 82  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 15  
gccccgcctcc agagctctgg tgtcatggtc gccgtcgctg ccggtaacaa caacgctgac 60  
gccccgcaact actccccctgc tt 82

<210> 16  
<211> 80  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16  
gttggagaag ctggagcggc ggtcgtagcg gtcagaagca ccgacggtgc agaccgaggg 60  
ctcagaagca ggggagtagt 80

<210> 17  
<211> 83  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 17  
ctccagcttc tccaactacg gcagcgttt ggacatcttc ggcctggta ccagcatctt 60  
ctccacactgg atcggcggca gca 83

<210> 18  
<211> 81  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 18  
tcatgaggta ggcagcgaga cccgcaacgt ggggagtagc catggaggta ccagagatgg 60  
agcgggtgct gcccggatc c 81

<210> 19  
<211> 81  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 19  
ctgcctacccatgacccatggaaagacca cccggccag cgcttgcgt tacatgcgg 60  
acaccgccaa caagggcgac t 81

<210> 20  
<211> 87  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 20  
atataagctt ctattaagcc tggtagttgt tggtaggctaa caggttgacg gtgccgaagg 60  
gaatgttgct taagtcggcc ttgttgg 87

<210> 21  
<211> 384  
<212> PRT  
<213> Tritirachium album Limber

<400> 21  
Met Arg Leu Ser Val Leu Leu Ser Leu Leu Pro Leu Ala Leu Gly Ala  
1 5 10 15

Pro Ala Val Glu Gln Arg Ser Glu Ala Ala Pro Leu Ile Glu Ala Arg  
20 25 30

Gly Glu Met Val Ala Asn Lys Tyr Ile Val Lys Phe Lys Glu Gly Ser  
35 40 45

Ala Leu Ser Ala Leu Asp Ala Ala Met Glu Lys Ile Ser Gly Lys Pro  
50 55 60

Asp His Val Tyr Lys Asn Val Phe Ser Gly Phe Ala Ala Thr Leu Asp  
65 70 75 80

Glu Asn Met Val Arg Val Leu Arg Ala His Pro Asp Val Glu Tyr Ile  
85 90 95

Glu Gln Asp Ala Val Val Thr Ile Asn Ala Ala Gln Thr Asn Ala Pro  
100 105 110

Trp Gly Leu Ala Arg Ile Ser Ser Thr Ser Pro Gly Thr Ser Thr Tyr  
115 120 125

Tyr Tyr Asp Glu Ser Ala Gly Gln Gly Ser Cys Val Tyr Val Ile Asp  
130 135 140

Thr Gly Ile Glu Ala Ser His Pro Glu Phe Glu Gly Arg Ala Gln Met  
145 150 155 160

Val Lys Thr Tyr Tyr Ser Ser Arg Asp Gly Asn Gly His Gly Thr  
165 170 175

His Cys Ala Gly Thr Val Gly Ser Arg Thr Tyr Gly Val Ala Lys Lys  
180 185 190

Thr Gln Leu Phe Gly Val Lys Val Leu Asp Asp Asn Gly Ser Gly Gln  
195 200 205

Tyr Ser Thr Ile Ile Ala Gly Met Asp Phe Val Ala Ser Asp Lys Asn  
210 215 220

Asn Arg Asn Cys Pro Lys Gly Val Val Ala Ser Leu Ser Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Gly Tyr Ser Ser Ser Val Asn Ser Ala Ala Ala Arg Leu Gln Ser Ser  
245 250 255

Gly Val Met Val Ala Val Ala Ala Gly Asn Asn Asn Ala Asp Ala Arg  
260 265 270

Asn Tyr Ser Pro Ala Ser Glu Pro Ser Val Cys Thr Val Gly Ala Ser  
275 280 285

Asp Arg Tyr Asp Arg Arg Ser Ser Phe Ser Asn Tyr Gly Ser Val Leu  
290 295 300

Asp Ile Phe Gly Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr Trp Ile Gly Gly  
305 310 315 320

Ser Thr Arg Ser Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala  
325 330 335

Gly Leu Ala Ala Tyr Leu Met Thr Leu Gly Lys Thr Thr Ala Ala Ser  
340 345 350

Ala Cys Arg Tyr Ile Ala Asp Thr Ala Asn Lys Gly Asp Leu Ser Asn  
355 360 365

Ile Pro Phe Gly Thr Val Asn Leu Leu Ala Tyr Asn Asn Tyr Gln Ala  
370 375 380

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
22. August 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/064760 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/58,  
15/52, 15/66, 15/67, 15/80, C12P 21/00

KIRSCHBAUM, Thomas [DE/DE]; Humboldstrasse 3,  
81543 Muenchen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01144

(81) Bestimmungsstaaten (national): CA, CN, CZ, JP, US.

(22) Internationales Anmelddatum:  
5. Februar 2002 (05.02.2002)

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, TR).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für die folgenden Bestimmungsstaaten CA, CN, CZ, JP

(30) Angaben zur Priorität:  
101 05 911.6 9. Februar 2001 (09.02.2001) DE

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(71) Anmelder (nur für DE): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (DE).

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von DE, US): F.HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(72) Erfinder; und

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MUELLER, Rainer [DE/DE]; An der Freiheit 54, 82377 Penzberg (DE). THALHOFER, Johann-Peter [DE/DE]; Krottenkopfstrasse 9b, 82362 Weilheim (DE). GEIPEL, Frank [DE/DE]; Nelkenstrasse 23, 82377 Penzberg (DE). GLASER, Stephan [DE/DE]; Heimgartenstrasse 5, 82402 Seeshaupt (DE). HOELKE, Werner [DE/DE]; An der Freiheit 73, 82377 Penzberg (DE). SCHOEN, Helmut [DE/DE]; Grube 4a, 82377 Penzberg (DE).

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 27. Dezember 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/064760 A3

(54) Title: EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINASE K FROM TRITIRACHIUM ALBUM IN YEAST

(54) Bezeichnung: EXPRESSION DER REKOMBINANTEN PROTEINASE K AUS TRITIRACHIUM ALBUM IN HEFE

(57) Abstract: The invention relates to a method for the expression in solution of a proteinase K encoding gene in yeast, for example in *Pichia pastoris*, and subsequent secretion thereof into the culture medium. The invention further relates to a purification method of the heterologously expressed and secreted proteinase K.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur löslichen Expression eines für die Proteinase K kodierenden Gens in Hefe, z.B. in *Pichia pastoris*, mit anschließender Sekretion in das Kulturmödium. Des weiteren wird ein Aufreinigungsverfahren der heterolog exprimierten und sekretierten Proteinase K beschrieben.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte  
onal Application No  
PCT/EP 02/01144

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/58 C12N15/52 C12N15/66 C12N15/67 C12N15/80  
C12P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PENHEITER ALAN R ET AL: "Purification and characterization of a soybean root nodule phosphatase expressed in <i>Pichia pastoris</i>." PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 14, no. 1, October 1998 (1998-10), pages 125-130, XP002216461 ISSN: 1046-5928 abstract page 127, right-hand column, paragraph 2 -page 128, right-hand column, paragraph 1 page 129, right-hand column, paragraph 1 -page 130, left-hand column, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-3, 6, 9-11, 15-17

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*S\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

11 October 2002

Date of mailing of the International search report

25/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte  
nal Application No  
PCT/EP 02/01144

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SAMAL B ET AL: "Cloning and expression of the gene encoding a novel proteinase from <i>Tritirachium album limber</i> ." ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY. UNITED STATES 1996, vol. 379, 1996, pages 95-104, XP008009215 ISSN: 0065-2598 cited in the application abstract page 100, paragraph 2 -page 104, paragraph 1 —	1-3,6, 9-11, 15-17
A	WO 88 07581 A (AMGEN INC) 6 October 1988 (1988-10-06) page 4, line 27 -page 5, line 9 page 7, line 31 -page 9, line 26; examples 1,9 —	1
A	EBELING W ET AL: "PROTEINASE K FROM <i>TRITIRACHIUM ALBUM LIMBER</i> " EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 47, 1974, pages 91-97, XP000864618 ISSN: 0014-2956 cited in the application abstract page 92, left-hand column, paragraph 3 -right-hand column, paragraph 1 page 93, right-hand column, paragraph 3 -page 94, right-hand column, paragraph 2 —	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intel. **International Application No**  
**PCT/EP 02/01144**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 8807581	A 06-10-1988	AT	139567 T	15-07-1996
		AU	617996 B2	12-12-1991
		AU	1571688 A	02-11-1988
		CA	1331154 A1	02-08-1994
		DE	3855375 D1	25-07-1996
		DE	3855375 T2	14-11-1996
		DK	672088 A	03-02-1989
		EP	0309550 A1	05-04-1989
		FI	885635 A	02-12-1988
		IL	85954 A	28-11-1994
		JP	1502798 T	28-09-1989
		JP	2731407 B2	25-03-1998
		KR	9709949 B1	19-06-1997
		NO	885391 A ,B,	03-02-1989
		WO	8807581 A1	06-10-1988
		US	5278062 A	11-01-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte	onales Aktenzeichen
PCT/EP 02/01144	

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES					
IPK 7	C12N9/58	C12N15/52	C12N15/66	C12N15/67	C12N15/80
C12P21/00					

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>PENHEITER ALAN R ET AL: "Purification and characterization of a soybean root nodule phosphatase expressed in <i>Pichia pastoris</i>." PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, Bd. 14, Nr. 1, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 125-130, XP002216461 ISSN: 1046-5928 Zusammenfassung Seite 127, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 128, rechte Spalte, Absatz 1 Seite 129, rechte Spalte, Absatz 1 -Seite 130, linke Spalte, Absatz 2</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-3, 6, 9-11, 15-17

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :  
 "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

11. Oktober 2002

25/10/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, TX. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mateo Rosell, A.M.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte	nales Aktenzeichen
PCT/EP 02/01144	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>SAMAL B ET AL: "Cloning and expression of the gene encoding a novel proteinase from <i>Tritirachium album limber</i>."  <b>ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY.</b> UNITED STATES 1996,  Bd. 379, 1996, Seiten 95-104, XP008009215  ISSN: 0065-2598  in der Anmeldung erwähnt  Zusammenfassung  Seite 100, Absatz 2 -Seite 104, Absatz 1</p> <p>—</p>	1-3,6, 9-11, 15-17
A	<p>WO 88 07581 A (AMGEN INC)  6. Oktober 1988 (1988-10-06)  Seite 4, Zeile 27 -Seite 5, Zeile 9  Seite 7, Zeile 31 -Seite 9, Zeile 26;  Beispiele 1,9</p> <p>—</p>	1
A	<p>EBELING W ET AL: "PROTEINASE K FROM <i>TRITIRACHIUM ALBUM LIMBER</i>"  <b>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY</b>, BERLIN,  DE,  Bd. 47, 1974, Seiten 91-97, XP000864618  ISSN: 0014-2956  in der Anmeldung erwähnt  Zusammenfassung  Seite 92, linke Spalte, Absatz 3 -rechte  Spalte, Absatz 1  Seite 93, rechte Spalte, Absatz 3 -Seite  94, rechte Spalte, Absatz 2</p> <p>—</p>	1

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/01144

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8807581	A 06-10-1988	AT	139567 T	15-07-1996
		AU	617996 B2	12-12-1991
		AU	1571688 A	02-11-1988
		CA	1331154 A1	02-08-1994
		DE	3855375 D1	25-07-1996
		DE	3855375 T2	14-11-1996
		DK	672088 A	03-02-1989
		EP	0309550 A1	05-04-1989
		FI	885635 A	02-12-1988
		IL	85954 A	28-11-1994
		JP	1502798 T	28-09-1989
		JP	2731407 B2	25-03-1998
		KR	9709949 B1	19-06-1997
		NO	885391 A ,B,	03-02-1989
		WO	8807581 A1	06-10-1988
		US	5278062 A	11-01-1994